

COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES EN OVINOS CON CUADRO CLÍNICO NERVIOSO (VISNA)

Ramírez, H.¹, Hernández, M. M.¹, Cenoz, A.¹, Glaría, I.¹, de Andrés, X.¹, Crespo, H.¹, San Román, B.¹, Jáuregui, P.¹, Reina, R.¹, Grilló, M. J.¹, Benavides, J.², Polledo, L.², Pérez, V.², García-Marín, J. F.², Amorena, B.¹, de Andrés, D.¹

¹Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra, Mutilva Baja, Navarra. hugo.ramirez@unavarra.es. ²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, León.

INTRODUCCIÓN

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) causan artritis, mastitis, neumonía intersticial (Maedi) y leucoencefalitis (Visna) en ovinos y caprinos. Durante la infección los LVPR podrían colonizar diferentes órganos del individuo en los que aparecerían algunas poblaciones virales diferentes, como se ha descrito en infecciones por lentivirus de otras especies (Chen, 2006; Liu, 2006). Esta distribución de secuencias concretas en distintos órganos se ha denominado compartimentalización. El sistema nervioso central (SNC) ofrece un medio ambiente único para los LVPR, ya que cuenta con la presencia de la barrera hemato-encefálica que restringe el tráfico viral y la respuesta inmune. Diversos trabajos describen la compartimentalización en VIH, encontrándose una alta variación de las secuencias nucleotídicas, particularmente en zonas hipervariables de la región *env*. La región hipervariable V3 en VIH es determinante del tropismo celular y de la eficiencia de la replicación al relacionarse con la adsorción y fusión del virus a la célula en cepas macrófago-trópicas (Korber, 1994). Además, en individuos infectados crónicamente, ciertos aminoácidos de la región V3 modulan el neurotropismo y neurovirulencia (Pillai, 2006). En el ámbito de los LVPR existe una región hipervariable (V4) análoga a la V3 de VIH (Pisoni, 2007) y, hasta la fecha, se ha observado una compartimentalización en la mama de algunos individuos afectados por la forma mamaria (Pisoni, 2007), pero no se ha determinado la posible existencia de compartimentalización en el sistema nervioso correspondiente a la forma nerviosa de la enfermedad, lo que constituye el objetivo primordial de este estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se determinaron 150 secuencias de la región V4 de VMV a partir de dos ovinos de raza Assaf, un macho (mayor de 2 años, denominado **A**) y una hembra (mayor de 4 años, denominada **B**) procedentes de un brote nervioso de la enfermedad en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Ambos animales murieron con sintomatología clínica nerviosa, encontrando macroscópicamente principalmente lesiones de malacia en la sustancia blanca del encéfalo e histológicamente mielitis. Además, se encontraron lesiones leves en pulmón y mama en los animales **A** y **B**, respectivamente. Para la obtención de las secuencias, en primer lugar se extrajeron muestras de médula espinal, plexo coroideo, mama o testículo, pulmón, lavado broncoalveolar (BAL) y sangre (células mononucleares, PBMC). De dichas muestras se extrajo ADN utilizando QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) y se realizaron por triplicado diluciones quintuplas seriadas (dilución limitante), para evitar la presencia de distintos moldes de ADN en la muestra. Mediante PCR, se amplificó la región V4 con cebadores *env* previamente descritos (Mordasini, 2006). Los amplicones se purificaron, ligaron y clonaron en el vector pGEMT-easy[®]. Se seleccionaron entre 50 y 75 colonias supuestamente positivas y se realizó la extracción del ADN plasmídico con Quantum Prep[®] (Bio-Rad). El ADN obtenido se secuenció, las secuencias (150) se analizaron con el programa Clustal X y los árboles filogenéticos se construyeron con el método de Neighbour Joining con corrección de Kimura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras obtenidas de los dos animales utilizados en este estudio se obtuvieron secuencias nucleotídicas, a excepción del testículo. El análisis de compartimentalización demostró que ésta existía en el animal **A** (Fig. 1A), pues las secuencias VMV derivadas de médula espinal y plexo coroideo mostraron una similitud entre sí de más del 98 %, lo que las ubicó filogenéticamente dentro de un mismo grupo. Dichas secuencias, a su vez, mostraron una similitud algo menor (95–97,8%) con algunas secuencias de VMV obtenidas de macrófagos BAL pero formaron en conjunto una única rama en el correspondiente árbol. Las restantes secuencias obtenidas de VMV de pulmón, PBMC y BAL se entremezclaron en diferentes ramas, formadas con grupos de secuencias filogenéticamente similares ($\geq 85,3\%$). En el animal **B** (Fig. 1B), se observó una gran heterogeneidad entre las diferentes secuencias derivadas de SNC. El árbol filogenético mostró 3 ramas bien definidas: i) una que sólo agrupó (similitud: 95,4-98,4%) 3 secuencias derivadas de PBMC y 2 derivadas de pulmón (debido a su pequeño número, no es posible determinar con certeza la existencia de compartimentalización); ii) otra que agrupó (similitud: 87,8-100%) secuencias derivadas de médula espinal, plexo coroideo, mama y PBMC; y iii) otra que agrupó (similitud: 96,4-100%) todas las secuencias derivadas de macrófagos BAL y algunas obtenidas de médula espinal, plexo coroideo, mama y PBMC. Fue muy interesante observar que las distancias filogenéticas entre la tercera rama y las otras dos eran muy grandes (la divergencia alcanzando hasta el 25,6%).

En conclusión, se encontró una evidente compartimentalización en secuencias virales derivadas de SNC en el animal **A** y no así entre las secuencias derivadas del SNC del animal **B**.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chen, M.F., Westmoreland, S., Ryzhova, E.V., et al. 2006. *J Neurovirol.* 12: 73-89.
- Korber, B.T., Kunstman, K.J., Patterson, B.K., et al. 1994. *J Virol.* 68(11): 7467-7481.
- Liu, P., Hudson, L.C., Tompkins, M.B., et al. 2006. *J Neurovirol.* 12: 307-321.
- Mordasini, F., Vogt, H.R., Zahno, M.L., et al. 2006. *J Clin Microbiol.* 3: 981-991.
- Pillai, S.K., Pond, S.L., Liu, Y., et al. 2006. *Brain.* 129: 1872-1883.
- Pisoni, G., Moroni, P., Turín, L. & Bertoni, G. 2007. *Virology.* 369: 119-130

Agradecimientos: Financiado por CICYT (AGL2007-66874-C04) y Gobierno de Navarra (IIQ010449.RI1).

COMPARTMENTALIZATION IN THE VISNA CLINICAL FORM OF SHEEP SMALL RUMINANT LENTIVIRUS INFECTION

ABSTRACT: A total of 150 sequences of the V4 hypervariable *env* region of sheep small ruminant lentivirus (SRLV) genome was obtained from two Assaf sheep of a sheep nervous outbreak, both with clinical visna signs. These sequences were obtained from spinal cord, choroid plexus, mammary gland, lung, bronchoalveolar (BAL) macrophages and blood (PBMC). Phylogenetic analysis demonstrated a clear compartmentalization in one of these sheep, a 2-year old male, as VMV sequences derived from spinal cord and choroid plexus had a similarity amongst them higher than 98%, which allowed them to be grouped into a differentiated genetic group. In the other animal (a 4-year old female) there was no such a clear compartmentalization and there were three definite clusters, one of which was genetically distant from the other two.

Keywords: *Compartmentalization, visna, small-ruminant-lentivirus, sheep*

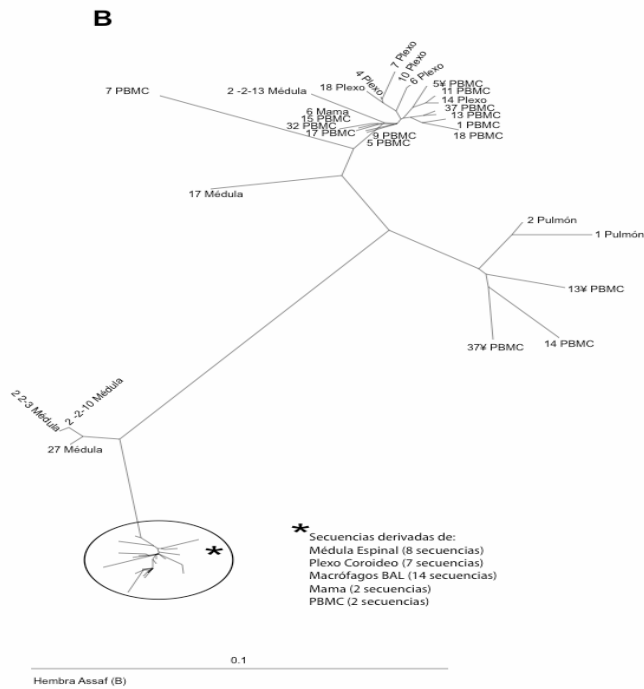
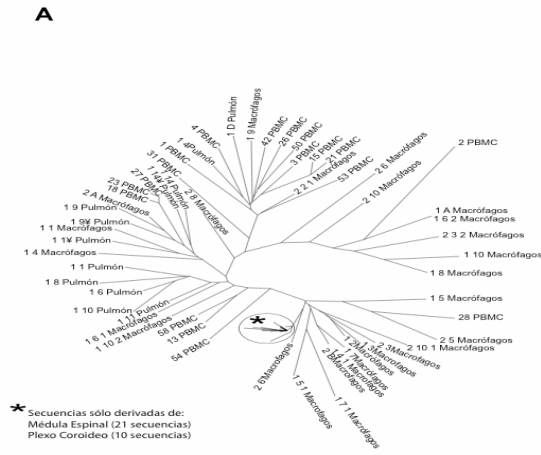


Figura 1. Árboles filogenéticos correspondientes a las 150 secuencias obtenidas a partir de SNC (médula espinal y plexo coroideo), pulmón, BAL, mama y PBMC de la región V4 de env en LVPR de un macho (A) y una hembra (B) de raza Assaf.